

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-167232

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)6月27日

A 61 K 37/465
B 01 D 63/02

8615-4C
6953-4D

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 ウイルス除去方法

⑯ 特 願 昭63-320349

⑰ 出 願 昭63(1988)12月21日

⑱ 発 明 者 大 澤 直 樹 宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成工業株式会社内
⑲ 発 明 者 平 崎 智 子 宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成工業株式会社内
⑳ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

明 細 書

1. 発明の名称

ウイルス除去方法

2. 特許請求の範囲

(1) 血液凝固第八因子製剤からウイルスを除去する方法において、血液凝固第八因子製剤を銅アンモニア法再生セルロース製多孔膜中空糸を用いたフィルターで濾過することを特徴とする血液凝固第八因子製剤からのウイルス除去方法

(2) 血液凝固第八因子製剤からウイルスを除去する方法において、血液凝固第八因子製剤を銅アンモニア法再生セルロース製多孔膜中空糸を用いて多段に濾過し、その際前段のフィルターに使用する中空糸の平均孔径がその次に使用するフィルターのそれよりも小さくないように配置することを特徴とする血液凝固第八因子製剤からのウイルス除去方法

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、感染性ウイルス粒子による感染のお

それのない(ウイルスフリー)血液凝固第八因子製剤を取得するために血液凝固第八因子製剤中からエイズウイルス(HIV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、等の感染性ウイルスを除去する方法に関する。本発明の方法は、血液凝固第八因子製剤を製造する血液製剤分画工程の最終的段階で実施することも、また病院において血友病患者に血液凝固第八因子製剤を輸注する直前に実施することも可能である。

(従来技術)

血液凝固第八因子製剤は血友病Aの患者の治療のために開発され、近年大量に利用されるようになったが1985年以来エイズウイルス(以下単にHIVと称す)のキャリア数の増加に伴って血液凝固第八因子製剤へHIVが混入しHIVで汚染された血液凝固第八因子製剤を用いた血友病の患者にHIVが感染するという事故が多発した。この感染を防ぐため抗原抗体反応を利用した試験による採血漿のスクリーニングおよび血液凝固第八因子製剤の凍結粉末の加熱処理が義務づけられるよ

うになった。これらの安全対策の実施により感染事故数は大幅に低下したがまだ依然として感染事故が発生している。また最近では熱処理された血液凝固第八因子製剤によるB型肝炎、Non A Non B型肝炎の感染が問題になっている。このため加熱によるウイルス除去効果を高めるために粉末状態で加熱ではなく、水溶液状態で加熱（液状加熱）を行なう方法が奨励されている。液状加熱の導入により感染率はさらに低下するものと期待されている。しかしながら血液凝固第八因子製剤を加熱すると血液凝固活性そのものも低下し、その低下率は粉末加熱の場合より液状加熱の方が大きく、条件によっては歩留まりが40～50%であると言われている。血液凝固第八因子製剤の製造は大量の原料血漿を必要とすることから加熱処理による歩留まりの低下は原料血漿の手当の面からも血液凝固第八因子製剤のコストの面からも大きな問題である。

（本発明が解決しようとする課題）

本発明はHIVはもちろんのことHBVあるいは

はNon A Non B型肝炎ウイルスを確実に除去しながら高い収率で血液凝固第八因子製剤を得ることのできるウイルス除去方法を提供するためになされたものである。

（課題を解決するための手段）

本発明者等が鋭意研究を進めたところ、血液凝固第八因子製剤を濾過するに際し、銅アンモニア法再生セルローズ製多孔膜中空糸を用いたフィルターを使用することによって、血液凝固第八因子製剤中のウイルスを除去することが可能になることを見だし、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

本発明は、血液凝固第八因子製剤を銅アンモニア法再生セルローズ製多孔膜中空糸を用いたフィルターで濾過して血液凝固第八因子製剤に含まれるウイルスを除去するウイルス除去方法である。

本発明に用いる銅アンモニア法再生セルローズ製多孔膜中空糸は銅アンモニアセルローズ溶液から製造される。再生セルローズにはビスコース法、セルローズエステルのケン化法、銅アンモニア法

など、種々のものがあるが、その中でも銅アンモニア法は、その独自の凝固、再生方法のため、他の再生セルローズとは異なる優れた性質を有する。その特徴のひとつは親水性でかつ蛋白質の吸着性が小さい点にある。本発明方法に用いられる銅アンモニア法再生セルローズからなる多孔膜中空糸が既存の中空糸の中で一番吸着性が小さい。

本発明に用いる銅アンモニア法再生セルローズ製多孔膜中空糸は水流速法で測定した平均孔径が通常人工腎臓用途に用いられる銅アンモニア法再生セルローズ製中空糸と異なり、10～100nmの範囲にあり、しかも壁厚全面においてスキン構造を有さない。

また、本発明に用いる銅アンモニア法再生セルローズ製多孔膜中空糸は該中空糸の内壁面から外壁面への膜厚方向に層状構造を有している。このため高い蛋白質の透過性と高いウイルスの阻止性能を併せ持っている。

本発明に用いる銅アンモニア法再生セルローズ製多孔膜中空糸の膜厚は薄ければ薄いほど濾過速

度が大きくなるので好ましい。しかしながら、膜厚が10μm未満になると、中空糸にはピンホールが多発し、ウイルス粒子が濾液中に洩れ出てくる。また膜厚が100μm以上になると濾過速度が大きく低下する。

また本発明は、血液凝固第八因子製剤を濾過するに際し、好ましくは銅アンモニア法再生セルローズ製多孔膜中空糸を用いたフィルターを多段に使用しかつ前段のフィルターに使用する中空糸の平均孔径がその次に使用するフィルターのそれよりも小さくない様に配置するものである。

血液凝固第八因子製剤は、コーンのエタノール分画法によりクリオプレシビテート分画から得られる。クリオプレシビテートは血液凝固第八因子の他にフィブリノーゲン等の夾雑タンパクを含んでいる。その後の処理により血液凝固第八因子以外の成分の除去が行われ、血液凝固第八因子の濃縮が進行するが、最終製品中にはなおフィブリノーゲンをはじめとする血液凝固第八因子以外のタンパク成分が多量に含まれる。このような血液凝固

第八因子製剤を濾過するにあたり、銅アンモニア法再生セルロース製多孔膜中空糸を用いたフィルターを多段に使用しかつ前段のフィルターに使用する中空糸の平均孔径がその次に使用するフィルターのそれよりも小さくないように配置することによって高い血液凝固第八因子回収率と高いウイルス阻止率の両者が満足される。

前段に使用するフィルターの平均孔径は小さすぎるとタンパクの回収率が下がるため50nm以上が望ましく、さらに高い回収率を得るためには60nm以上が望ましい。さらに、ウイルスの除去率は、フィルターの段数を増やすことによって向上するので段数を増やすことを前提とするならば血液凝固第八因子の回収率を高めるために80nm以上の平均孔径のフィルターを使用することも可能である。後段に使用するフィルターの平均孔径は前段と同じか小さいものであることが要求される。小さいものであるほどウイルスの阻止率が大きくなるが一方で血液凝固第八因子の回収率が低下してしまう。そのため30nm以上であることが望まし

い。

フィルターの段数はフィルターの平均孔径の組み合わせとの関係で適宜選択すればよい。血液凝固第八因子製剤は前述のようにフィブリノーゲン等の交雑タンパクを多量に含んでおり、しかもその含有量は製剤の製造条件によって大きく異なる。したがってフィルターの平均孔径、段数等の適正な条件はそれぞれの製剤について実験にもとづいて定めることが必要である。

本発明方法による実施例を説明するに先立ち、本明細書中に用いられた各種物性値の測定方法を以下に示す。

〔水流速平均孔径〕

銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔膜中空糸のモジュールを作製し、そのモジュール状態で中空糸の水の流出量を測定し、(1)式から水流速平均孔径(D)を求めた。

$$D(nm) = 2.0 \times \sqrt{\frac{V \cdot T \cdot \mu}{P \cdot A \cdot Pr}} \quad (1)$$

V : 流出量 (ml/min)
T : 膜厚 (μm)
P : 圧力差 (mmHg)
A : 膜面積 (㎡)
Pr : 空孔率
μ : 水の粘性率 (cp)

空孔率 Pr は水膨潤時の見かけ密度 ρ_{aw}、ポリマーの密度 ρ_p より(2)式で求めた。セルロースの場合、ρ_p = 1.561 を用いた。

$$Pr(\%) = (1 - \rho_{aw} / \rho_p) \times 100 \quad (2)$$

〔ウイルスの阻止係数の測定〕

本発明におけるウイルス除去に関する効果の判定は大腸菌ファージの一種であるファイエックス174 (以下 φ×174 と称す) の対数減少率 (log reduction value 又は LRV) で表わされた阻止係数を測定することによっておこなった。φ×174 は直径約 25 nm であるため、直径 42 nm を有する HBV は φ×174 より高い阻止係数で除去されることができると考えることができる。φ×174 の LRV の測定はフィルターの膜面積 1 ㎡あたり 10⁸

個のウイルスを含む培地溶液を濾過し、濾液中のウイルス濃度を測定することによって下記の式により LRV を求める。

$$\text{阻止係数 (LRV)} = \log \frac{\text{元液中のウイルス濃度}}{\text{濾液中のウイルス濃度}}$$

〔実施例〕

次に実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

〔実施例 1 ~ 4〕

セルロースリンターを公知の方法で調製した銅アンモニア溶液中に 8 wt% の濃度で溶解し、濾過脱泡を行ない、紡糸原液とした。その紡糸原液を環状紡糸口の外側紡出口 (外径 2 mm φ) から、一方中空糸として、アセトン 50 wt% / アンモニア 0.6 wt% / 水 49.4 wt% の混合溶液を中央紡出口 (外径 0.6 mm φ) からそれぞれアセトン 40 wt% / アンモニア 0.6 wt% / 水 59.4 wt% (凝固剤) 中に直接吐出し 10 m / min の速度で巻き取った。その後、真空乾燥した (25℃、1.5 hr)。この様に

して得られた銅アンモニア法再生セルローズ製多孔膜中空糸の内径は250.0 μm 、膜厚は25.0 μm 、水流速平均孔径は30nm、空孔率は39%であった。

以下セルローズ濃度6.8%、5.7%、5.4%の紡糸原液を調製し、同様の条件で紡糸・乾燥を行い、表1記載の中空糸を得た。

これらの中空糸500本をたばね有効膜面積0.03 m^2 のモジュールに成型したものを実施例1~4とした。

次にA社の加熱処理血液凝固第八因子製剤を2500単位/ ml の溶液に調製し、かつこの溶液に別途培養した $\phi \times 174$ の培養液を 3×10^8 PFU/ ml の濃度になるように添加し該溶液100 ml を上記の各種モジュールで1 ml/min の流速で濾過した。結果を表2に示す。

表2より、この方法では、高い血液凝固第八因子回収率と高い阻止率の両者を満足することはむずかしいが、一応可能である。

(実施例5~10)

上記方法によって得られた平均孔径の異なる中空糸によるモジュールを表3に示す様に組み合わせ、実施例1~4と同様の濾過実験を行った。結果を表3に示す。

表3より、フィルターを多段で用いることにより、高い血液凝固第八因子回収率及び高いウイルス阻止係数の両者を満足することは明らかである。(発明の効果)

本発明により、多孔膜を用いて、血液凝固第八因子製剤より、その活性を低下させることなくウイルス(特にHBV)を除去できる様になり、フィルターを多段にすることにより、血液凝固第八因子の回収率とウイルスの阻止係数の両者を満足させる濾過ができる様になった。

以下余白

表 1

セルローズ濃度 %	中空糸組成 アセトン/アンモニア/水	凝固剤組成 アセトン/アンモニア/水	内径 μm	膜厚 μm	水流速平均孔径 nm	空孔率 %
8.0	50/0.65/49.35	40/0.65/59.35	250	25	30	39
6.8	50/0.65/49.35	40/0.65/59.35	250	25	50	42
5.7	50/0.65/49.35	40/0.65/59.35	250	25	70	39
5.4	50/0.65/49.35	40/0.65/59.35	250	25	90	35

表 2

	フィルター の平均孔径 (nm)	血液凝固第八因子製剤 (%)	$\phi \times 174$ のLRV
実施例1	30	43.9	7.0
実施例2	50	61.4	3.5
実施例3	70	88.0	1.8
実施例4	90	98.6	0.2

以下余白

表 3

	フィルター の組合せ	血液凝固第八 因子回収率(%)	$\phi \times 174$ のLRV
実施例 5	一次フィルター-90nm 二次フィルター-50nm	93.8	3.8
実施例 6	一次フィルター-90nm 二次フィルター-30nm	73.5	7.1
実施例 7	一次フィルター-70nm 二次フィルター-50nm	88.4	5.3
実施例 8	一次フィルター-70nm 一次フィルター-30nm	67.7	>8.0
実施例 9	一次フィルター-90nm 二次フィルター-50nm 三次フィルター-50nm	90.1	7.2
実施例 10	一次フィルター-70nm 二次フィルター-50nm 三次フィルター-50nm	85.9	>8.0

特許出願人 旭化成工業株式会社